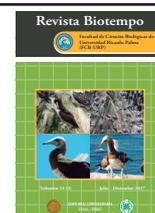




# Biotempo (Lima)



REVIEW ARTICLE / ARTÍCULO DE REVISIÓN

## MAMMALIAN SPERMATOGONIAL CELLS

## LAS ESPERMATOGONIAS DE MAMIFEROS

**Hugo Gonzales Figueroa & Hugo Mauricio Gonzales Molfino**

*Laboratorio de Biotecnología Animal. Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad Ricardo Palma. Lima, Perú  
hgonzalesfigueroa0@gmail.com*

### ABSTRACT

In recent years, the scientific community is becoming increasingly interested in the knowledge of the biology of spermatogonia. This mini-review aims to announce the progress made in the origin and migration of primordial germ cells, their propagation and renewal, *in vitro* culture methods as well as the perspectives of the use of spermatogonial stem cells (SSCs) of mammals, mainly in regenerative biology. Mammalian spermatogonial stem cells are a population of cells that are found in very small amounts at the periphery of the seminiferous tubules, from which spermatozoa are produced continuously, throughout the life of the males. The SSCs, are the unique adult stem cells that, at this biological complexity level, can be recognized it which allows to deepen investigations about its organization and functions in biological models, different from the most studied mouse, such as humans, cattle, canines, for the importance of its knowledge in the use of strategies in reproductive biotechnology and in regenerative biology.

**Key words:** *in vitro* culture – Spermatogonial stem cells (SSCs) – primordial germ cells

### RESUMEN

En los últimos años, la comunidad científica se está interesando cada vez más por el conocimiento de la biología de la espermatogonia. Esta mini revisión tiene por finalidad divulgar algunos avances realizados acerca del origen y migración de las células germinales primordiales, de su propagación y renovación, de los métodos de cultivo *in vitro*, así como de las perspectivas del uso, de las células madre espermatogoniales (SSCs) de mamíferos, principalmente, en la biología regenerativa. Las células madre espermatogoniales de mamífero son una población de células que se encuentran en cantidades muy pequeñas en la periferia de los túbulos seminíferos, a partir de la cual se producen espermatozoides de manera continua, durante toda la vida de los machos y además, son las únicas células madre adultas que, en este nivel de complejidad biológica, pueden ser reconocidas; lo que permite profundizar investigaciones sobre su organización y funciones en modelos biológicos, diferentes al ratón el más estudiado, como en humanos, bovinos, caninos, por la importancia que tiene su conocimiento en la utilización de estrategias en biotecnología reproductiva y en la biología regenerativa.

**Palabras claves:** Células madre espermatogoniales (SSCs) – células germinales primordiales – cultivo *in vitro*

## INTRODUCCIÓN

Los mamíferos aseguran su variabilidad genética mediante los eventos mitóticos y meióticos que se originan en células diploides denominadas Células Madre Espermatogoniales cuya sigla: SSCs, proviene del inglés Spermatogonial Stem Cells. Estas células diploides constituyen el reservorio a partir del cual se producen espermatozoides de manera continua, durante toda la vida de los machos mamíferos. Estas SSCs existen en cantidades muy pequeñas en la periferia de los túbulos seminíferos, contándose en los roedores alrededor de 35.000 SSCs, que constituyen aproximadamente el 0,03% del total de su masa testicular (Tegelenbosch & de Rooij, 1993); sin embargo, a pesar de su escasez, son las únicas células madre adultas que, en este nivel de complejidad, pueden ser reconocidas y esto permite profundizar investigaciones sobre su organización y funciones biológicas en diversos modelos biológicos como el ratón, el más estudiado, humanos, bovinos, caninos, entre otros por la importancia que tiene su conocimiento en la utilización de estrategias en biotecnología reproductiva y en la medicina regenerativa.

Las SSCs constituyen una población heterogénea que muestra distintos grados de diferenciación. Las espermatogonias As (simple) son consideradas como las SSCs en los mamíferos no primates; en los roedores las SSCs son las de tipo A; en caninos se han identificado espermatogonias  $A_0$ , que son las que cumplen la función de reserva y dan origen a las espermatogonias  $A_1$  (Travis *et al.*, 2009). En bovinos (Aguilar *et al.*, 2004) las espermatogonias tipo A se han dividido en BSC (basal stem cell), ASPC (agregated spermatogonial stem cell) y CSPC (committed spermatogonial precursor cell) y en humanos se distinguen tres tipos de espermatogonias: oscuras (Ad), pálidas (Ap) y espermatogonias B (B), dentro de las Ad, se encuentran las SSCs. En todos los casos las células madre espermatogoniales (SSCs) se encuentran en íntimo contacto con la membrana basal del tubo seminífero y en circunstancias normales no tienen actividad proliferativa, pero entran en mitosis cuando el número de espermatogonias desciende dramáticamente.

Las propiedades de multipotencia y autorenovación de estas células madre espermatogoniales, les permite

en condiciones adecuadas dividirse indefinidamente conservando una población estable de SSCs, que en ambientes apropiados y recibiendo los estímulos adecuados pueden diferenciarse hacia diferentes tipos de células especializadas de un organismo adulto (Das *et al.*, 2008), son razones suficientes para hacer una revisión que contribuya a entender mejor algunos aspectos relacionados con la biología y cultivo *in vitro* de estas células madre adultas, así como las perspectivas de aplicaciones en la medicina regenerativa.

### Origen y migración de las células germinales primordiales

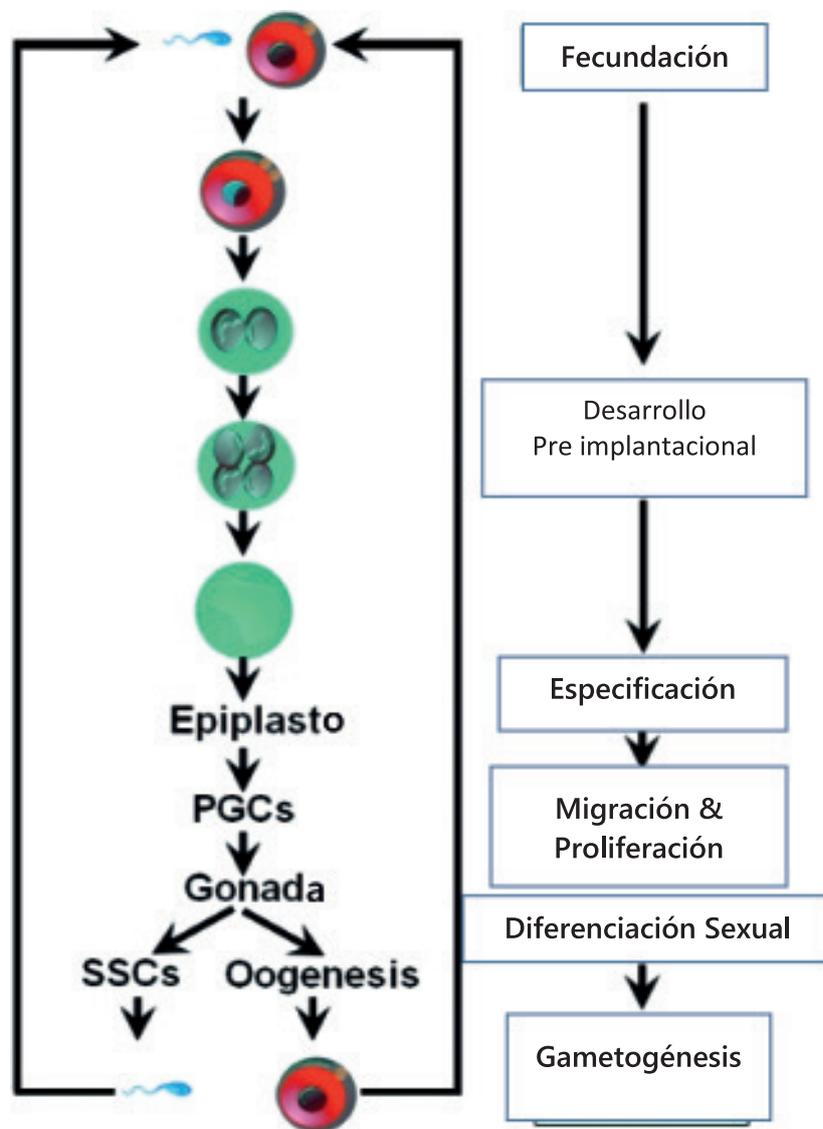
Durante el desarrollo embrionario de los mamíferos, al inicio de la gastrulación, del embrioblasto se diferencia el epiblasto (Boucher & Pedersen, 1996), donde se originan (Montiel-Eulefi *et al.*, 2001) las precursoras de las células germinales primordiales (*del inglés* PGCs), que son especificadas porque expresan algunos marcadores que también se expresan en las células germinales, como SSEA-1, F9, EMA, Oct4 y fosfatasa alcalina (Ying *et al.*, 2002). En embriones de ratón, cuando se está formando el surco primitivo entre los 7 y 7 1/2 días después del coito (dpc), se observan pequeñas agrupaciones de células provenientes del epiblasto que dan positivo a la fosfatasa alcalina y que han sido identificadas como las células precursoras (Lawson & Hage, 1994) de las PGCs; en humanos algunas PGCs son observadas en el epiblasto entre 12-14 dpc (De Felici, 2013).

Estas PGCs migran y se establecen transitoriamente en el mesodermo extraembrionario, principalmente en el alantoides (Ginsburg *et al.*, 1990), desde donde se trasladan por el interior de la expansión del intestino posterior y mesenterio dorsal hasta llegar a colonizar las crestas genitales (McLaren, 2003). La migración es asincrónica siendo las células germinales “pioneras” llamadas también gonocitos o pre o pro espermatogonias las primeras en salir del intestino posterior, por lo que llegan más rápido a las crestas genitales y guían a e inician la formación de la primera espermatogonia (Manku & Culty, 2015). El nicho de las células madre espermatogoniales es el compartimento anatómico que suministra señales a las mismas controlando su autorenovación, tasa de proliferación y linaje celular (Ogawa *et al.*, 2005). Entiéndase que “nicho se refiere a un microambiente especial compuesto por factores de creci-

miento incluyendo citocinas que regulan las funciones de las SSCs que son proveídas por las células de soporte testicular (Oatley & Brinster, 2012)

Gomperts *et al.* (1994) sugieren que una interacción adhesiva entre las células germinales “pioneras” y el tejido de las crestas genitales, puede jugar un papel en la ubicación de las PGCs a medida que se van agregando. Las PGCs, en el alantoides se encuentran en estado quiescente, y comienzan a proliferar durante la migración hacia las crestas genitales, entre los 8,5 a 12,5 dpc en ratón (Phillips *et al.*, 2010). Durante este proceso migratorio las PGCs sobreviven y proliferan de 100 (8 dpc) a 3000 (12,5 dpc), cantidad que al final coloniza

la gónada indiferenciada (Bendel-Stenzel *et al.*, 1998), en humanos la migración ocurre entre la quinta y octava semana de gestación (Riboldi *et al.*, 1992). Las PGCs una vez establecidas proliferan, se diferencian en gonocitos, y se asocian con las precursoras de las células de Sertoli y células miodes peritubulares (Kolasa *et al.*, 2012), los gonocitos proliferan por un par de días y luego se detienen en la fase  $G_0 / G_1$  del ciclo celular (fig.1). En ratas y ratones los gonocitos reanudan la proliferación durante la primera semana después del nacimiento, a la vez que se desplazan de la parte central a la periferia del túbulo seminífero, donde se establecen como espermatogonias debajo de la superficie de la membrana basal (Yoshida *et al.*, 2006).



**Figura 1.** Ciclo del desarrollo de la línea germinal, especificación y aparición de las células PGCs (adaptada de Mardanpour *et al.*, 2008).

### **Multiplicación y renovación de las espermatogonias**

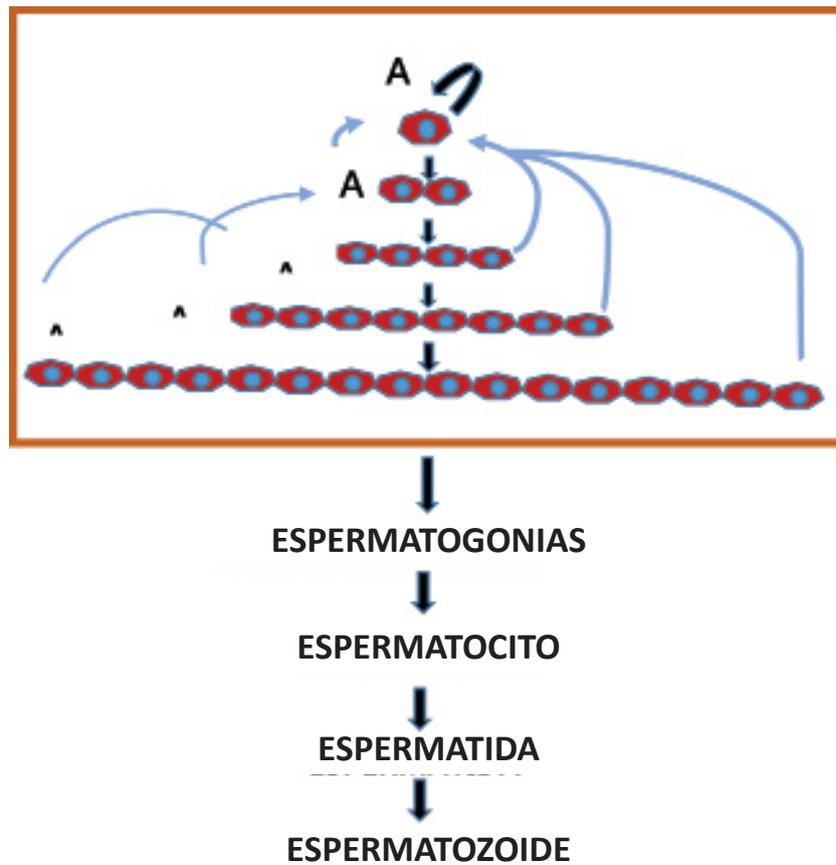
En los animales, los tejidos requieren un suministro continuo de células diferenciadas para realizar sus funciones. En el testículo de los mamíferos hay una alta tasa de recambio y diferenciación celular, de espermatogonias en espermatozoides, durante toda la vida del individuo (Caires *et al.*, 2010).

Las células madre espermatogoniales (SSCs) son espermatogonias indiferenciadas que mantienen el potencial de auto-renovación y la capacidad de diferenciarse en progenitores determinados, de manera que aseguran la espermatogénesis (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2014).

Durante la espermatogénesis en ratones adultos, la actividad de las células madre reside en un pequeño conjunto de espermatogonias indiferenciadas (de Rooij & Russell, 2000), que corresponden a las siguientes denominaciones: A simple (As), A pareada (Apr), y espermatogonias A alineadas (A<sub>al</sub>). La espermatogonia As por mitosis origina dos Apr, las que están conectadas por un puente intercelular (Fig.2). Estas espermatogonias Apr están destinadas para seguir dividiéndose en cadenas de 4 A-alineada (Aal), la cadena de espermatogonias alineadas pueden seguir dividiéndose en cadenas de 8 y 16 espermatogonias respectivamente (Spradling *et al.*, 2011). Todas las Aal se diferencian en espermatogonias que después de 6 divisiones mitóticas inician meiosis, espermiogénesis hasta diferenciarse en espermatozoides. Los puentes de estas cadenas están conformados por componentes de la citocinesis y por factores de las células germinales como TEX 14, una quinasa inactiva esencial para mantener la estabilidad de los puentes celulares (Greenbaum *et al.*, 2011).

La espermatogénesis como proceso continuo y productivo está estrictamente controlada en un microambiente especial (“nicho”) en los túbulos seminíferos, donde se encuentran las células de Sertoli, que interactúan directamente con los SSCs para controlar su proliferación y diferenciación a través de la secreción de factores específicos. Las células de Sertoli también regulan la producción de espermatozoides en el lado luminal de la barrera sangre-testículo a través de señales paracrina. Factores de crecimiento de las células de Sertoli como el factor neurotrópico derivado de las células gliales (GDNF) se expresa en la superficie de la membrana de espermatogonias tipo A (Hofmann *et al.*, 2005), así como el factor de crecimiento del fibroblasto (FGF2) entre otros, han sido identificados como los más importantes que regulan la auto renovación de las SSCs y la meiosis espermática (Chen & Liu, 2015).

Actualmente también existen marcadores moleculares que pueden usarse para identificar las SSCs. En ratón se ha encontrado que el factor de Inhibición de la Diferenciación 4 (ID4) es un marcador selectivo para A(s) (Sun *et al.*, 2015) en el testículo de animales adultos se ha encontrado como marcador de las A(s) al gen PAX7 (Aloisio *et al.*, 2014) Los genes para los factores de transcripción PLZF, SALL 4 y el gen supresor de tumores CDH1, cuya proteína es de la familia de las cadherinas, se expresan en todas las espermatogonias indiferenciadas (Suzuki *et al.*, 2009). Como se puede apreciar la caracterización molecular de las SSCs, será una herramienta importante para poder identificarlas, aislarlas y mantenerlas en cultivo por tiempo prolongado.



**Figura 2.** Modelo de la línea germinal en ratón (adaptado de Spradling *et al.*, 2011).

### Cultivo *in vitro*

En los últimos años han sido múltiples los trabajos que han puesto en evidencia la capacidad de las espermatogonias en la renovación del epitelio germinal tanto en modelos de xeno como de homotrasplante celular (Aguilar *et al.*, 2004).

Los intentos de aislamiento y cultivo *in vitro* de SSCs se iniciaron durante la década del 70 (Bellve *et al.*, 1977), como una fuente promisoría para la obtención de células pluripotentes, usando estrategias de enriquecimiento de células madre y de métodos de cultivo que proporcionen sistemas de ensayo reproducibles sobre la supervivencia y la replicación *in vitro* de las SSCs (Kubota *et al.*, 2004; Baazm *et al.*, 2013). En este contexto, se ha puesto mucho énfasis en el desarrollo de sistemas de cultivo *in vitro* para su mantenimiento, en estas condiciones, por un tiempo prolongado. Sin embargo, los esfuerzos realizados hasta el momento por establecer un protocolo adecuado de

cultivo *in vitro*, han sido obstaculizado, primero por la falta de marcadores específicos para la identificación de las células madre espermatogoniales, y, en segundo lugar, el conocimiento limitado de factores nutricionales y de crecimiento requeridos (Hofmann *et al.*, 2005; Hermann *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2012; Bellaiche *et al.*, 2014).

Para estudiar la dinámica proliferativa de espermatogonias *in vitro*, se ha utilizado fragmentos de testículo de ratones de nueve días de nacidos (Boitani *et al.*, 1993) y el cultivo de suspensiones de células aisladas (Tres & Kierszenbaum, 1993). De estos dos sistemas, el cultivo de suspensiones de células aisladas es el que más se viene utilizando. Actualmente se cuenta con diferentes protocolos experimentales para aislar y mantener en cultivo *in vitro* colonias de SSCs en diferentes especies. En el aislamiento y enriquecimiento de células madre espermatogoniales, se utilizan marcadores de expresión como Thy-1 y ERF-1 y de ausencia como c-kit (Shinohara *et al.*, 1999; Barros

*et al.*, 2012) principalmente, en las espermatogonias tipo A se expresan, además, los receptores para GDNF (Dettin *et al.*, 2003; von Schonfeldt *et al.*, 2004).

Los primeros intentos de aislamiento de SSCs consistieron en separar las espermatogonias tipo A por digestión enzimática de tejido testicular (Izadyar *et al.*, 2002). Este protocolo inicial se ha venido combinando con diferentes técnicas, entre las cuales encontramos el uso de gradiente de densidad discontinua (van Pelt *et al.*, 1996), como una de ellas. Precisamente usando el gradiente de densidad discontinua en testículos de perro doméstico, en nuestro laboratorio, se obtuvo un poco más de 93% células recuperadas, las células de ambas interfases de Percoll (45-60% y 30-45%) tuvieron actividad de fosfatasa alcalina en los dos métodos utilizados: el no enzimático y el enzimático. Se observó, además, que aquellas células aisladas por el método no enzimático son las que generan mayor número de colonias, pero no resisten a más de 3 pases o sub cultivos mientras que las células aisladas por el método enzimático resisten hasta 7 pases, pero forman un menor número de colonias. En gradiente discontinuo de Percoll también se recuperaron SSCs de los túbulos seminíferos de testículos de bovinos (Barros *et al.*, 2012), si bien este método permite recuperar un porcentaje relativamente alto de células madre espermatogoniales, en el caso de los bovinos no fue el más adecuado para purificar completamente las SSCs, sobre todo la que expresan el marcador a-6 integrina.

### Perspectivas

Las células madre espermatogoniales son responsables de la transmisión de la información genética de un individuo a su generación siguiente ya que a través del proceso espermatogénico, se asegura la continuidad de una especie. (Aguilar *et al.*, 2004). Si bien es cierto que en el nicho testicular estas células solo se diferencian a espermatozoides, cuando son aisladas y cultivadas *in vitro* en ambientes adecuados, adquieren o manifiestan pluripotencia y se diferencian a tejidos provenientes de las tres capas germinales (Golestaneh *et al.*, 2009). Una simple SSC puede adquirir pluripotencia, sin embargo, la conversión a un tipo celular pluripotente está acompañada por la pérdida del potencial espermatogénico (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2014), además Ning *et al.* (2010) demostraron que las SSCs de ratón se transdiferencian a células hematopoyéticas viables morfológica y funcionalmente. Actualmente existen numerosas evidencias que demuestran que

diversos tipos de células pluripotentes han sido generados y derivados de la línea células madre germinales- derivadas a células madre pluripotentes (GPSCs) en cultivo *in vitro* de testículos de ratón y de humano (Sungtae & Belmonte, 2011), las GPSCs también pueden diferenciarse a hepatocitos funcionales *in vitro* (Fagoonee *et al.*, 2010), razones suficientes para entender el gran potencial que tienen las GPSCs en la medicina regenerativa.

Por otro lado, la posibilidad de producir espermatozoides *in vitro* a partir de una GPSC tiene grandes alcances para la industria agropecuaria, en la restauración de la fecundidad humana, en la preservación de especies en peligro de extinción y varias otras tecnologías relacionadas con la reproducción de mamíferos. En algunos casos de infertilidad humana, sería suficiente tener un espermatozoide originado de una GPSC para producir descendencia a través de tecnologías de reproducción asistida (ARTs). Se podría establecer sistemas de cultivo de SSCs autólogas para individuos antes de tratamientos oncológicos y los espermatozoides generados *in vitro* podrían ser crioconservados para uso posterior y de esta manera garantizar la descendencia en estos pacientes. Además, estas técnicas también podrían proporcionar medios para preservar especies amenazadas, por ejemplo, poblaciones animales con muy pocos individuos que al momento de morir podrían tener sus SSCs recolectadas para que los espermatozoides se produzcan en el laboratorio (Aponte, 2015).

Las biotecnologías del SSCs requieren conocimientos específicos de las condiciones de cultivo *in vitro*, así como las técnicas de trasplante, y crioconservación dos aspectos a los que nos referiremos en esta mini revisión que de alguna manera resume el enfoque biotecnológico asociado al uso de las SSCs.

El trasplante de SSCs es una herramienta importante para otras aplicaciones biotecnológicas como la terapia génica o la restauración de la fecundidad. Esta técnica se inicia con los trabajos de Brinster & Zimmermann (1994) quienes lograron aislar células espermatogoniales de un testículo de ratón y transferirlas a los túbulos seminíferos de otro testículo estéril, donde la espermatogénesis ocurrió de manera normal dando lugar a espermatozoides viables. Un análisis cualitativo y cuantitativo de la actividad de las células madre (Ryu *et al.*, 2005) se puede comprobar con los resultados del trasplante de SSCs de ratones

fértiles a los túbulos seminíferos de ratones infértiles que dio lugar a una progenie con haplotipo derivado del donante, en este proceso las células del donante colonizan el nicho receptor, que implica la migración a la ubicación y la supervivencia apropiada, por lo que es importante determinar los factores necesarios para aumentar la proliferación y diferenciación de las colonias de células germinales donantes en testículos del receptor, por ejemplo trasplantar células germinales de primates a testículo de ratón (Nagano *et al.*, 2001). El análisis funcional de las SSCs consiste en un ensayo retrospectivo de la función espermatogénica. Las células son aisladas de los túbulos seminíferos del donador y trasplantadas a los túbulos seminíferos del receptor infértil, donde producen colonias normales de espermatogénesis y espermatozoides funcionales (Phillips *et al.*, 2010). La criopreservación es otra tecnología cuyos métodos deben optimizarse para incrementar la tasa de supervivencia de las SSCs después de la descongelación (Aliakbari *et al.*, 2016).

Estudios iniciales de Avarbock *et al.* (1996), usando técnicas similares para criopreservar células somáticas, demostraron que la criopreservación de SSCs es factible de realizarse. Las SSCs descongeladas trasplantadas a túbulos seminíferos de ratones estériles, hicieron que recuperen su capacidad fértil.

Sin embargo, no existen estudios relacionados a la evaluación de la eficiencia, de la criopreservación de SSCs con una mayor tasa de supervivencia, pero si existen algunos reportes donde se evalúan directamente los efectos de la criopreservación sobre las SSCs, así como estudios relacionados con la criopreservación de tejido testicular para la extracción posterior de SSCs (Keros *et al.*, 2007). Diversos estudios han demostrado que suspensiones de las SSCs de ratón, rata, conejo y babuino son capaces de sobrevivir después de permanecer por tiempo prolongado (12-14 años) en congelación. Las células de testículo de ratón y rata reinician la espermatogénesis en testículos receptores y pueden generar progenie normal y fértil sin errores genéticos o epigenéticos evidentes (Wu *et al.*, 2012). Así mismo poblaciones adultas y fetales SSEA-4 humanas mostraron diferente sensibilidad a la criopreservación, si habían sido congeladas *in situ* como tejidos testiculares o como suspensiones celulares (Yango *et al.*, 2014).

Diversos estudios han demostrado que sustancias como el glicerol, el dimetil sulfoxido (DMSO), el etileno

glicol (EG) o el polietileno glicol (PE) son sustancias crioprotectoras efectivas para la criopreservación de células y tejidos, pero su efectividad es variable para diferentes poblaciones de células testiculares. Se ha demostrado que la tasa de supervivencia post congelación y la estructura de los túbulos seminíferos se ven afectadas por el tipo de crioprotectores así como por las tasas de congelación (Milazzo *et al.*, 2008). Existen criterios diferentes en el uso de estos agentes crioprotectores, algunos consideran que los tejidos testiculares de hombre o de murinos se criopreservan mejor cuando se usa DMSO (Wyns *et al.*, 2008), otros consideran que el EG es más efectivo para mantener las espermatogonias en tejido testicular inmaduro humano (Kvist *et al.*, 2006) o que el PEG (2,5%) es el agente más eficiente para la criopreservación de SSCs (Yong-An *et al.*, 2013).

Esta ampliamente aceptado que las células germinales primordiales humanas y las células madre de la línea germinal neonatal y adulta de ratón son pluripotentes y muestran propiedades similares a las células madre embrionarias (Conrad *et al.*, 2008).

Es probable que estas técnicas sean aplicables a muchas especies, ya que las células de testículo de rata pueden ser criopreservadas y generar espermatogénesis en los túbulos seminíferos de ratones inmunodeficientes.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aliakbari, F.; Gilani, M.A.; Amidi, F.; Baazm, M., Korouji, M.; Izadyar, F.; Yazdekhesti, H. & Abbasi, M. 2016. Improving the efficacy of cryopreservation of spermatogonia stem cells by antioxidant supplements. *Cellular Reprogramming*, 18:87-95.
- Aloisio, G.M.; Nakada, Y.; Saatcioglu, H.D.; Peña, C.G.; Baker, M.D.; Tarnawa, E.D.; Mukherjee, J.; Manjunath, H.; Bugde, A.; Sengupta, A.L. & Amatruda, J.F. 2014. PAX7 expression defines germline stem cells in the adult testis. *Journal of Clinical Investigation*, 124:3929-3944.
- Aguilar, J.; Gonzalvo, M.C.; Clavero, A.; Ortiz, A.; González, E.; Ortiz-Galisteo, J.R.; Peralta, L.; Maza, M.; Castilla, J.A. 2004. Células madre

- espermatogonias. *Revista Internacional de Andrología*, 2:54-59.
- Aponte, P. M. 2015. Células madre espermatogoniales: Avances biotecnológicos actuales en reproducción y medicina regenerativa *World Journal of Stem Cells*, 7: 669-680.
- Avarbock, M.R.; Brinster, C. J. & Brinster, R. L. 1996. Reconstitution of spermatogenesis from frozen spermatogonial stem cells. *Nature Medicine*, 2: 693-696.
- Baazm, M.; Abolhassani, F.; Abbasi, M.; Roudkenar, M. H.; Amidi, F. & Beyer, C. 2013. An improved protocol for isolation and culturing of mouse spermatogonial stem cells. *Cellular Reprogramming*, 15: 1-9.
- Barros, F.; Worst, R.; Saurin, G.; Mendes, C.; Assumpção, M. & Visintin, J. 2012.  $\alpha$ -6 Integrin Expression in Bovine Spermatogonial Cells Purified by Discontinuous Percoll Density Gradient. *Reproduction Domestic Animals*, doi: 10.1111/j.1439-0531.01985. x.
- Bellaiche, J.; Lareyre, J. L.; Cauty, C.; Yano, A.; Allemand, I. & Le Gac, F. 2014. Spermatogonial Stem Cell Quest: nanos2, marker of a subpopulation of undifferentiated A spermatogonia in trout testis. *Biology of Reproduction*, 79:1-14.
- Bellve, A. R.; Cavicchia, J. C.; Millette, C. F.; O'Brien, D. A.; Bhatnagar, Y. M. & Dym, M. 1977. Spermatogenic cells of the prepuberal mouse. Isolation and morphological characterization. *Journal of Cell Biology*, 74:68-85.
- Bendel-Stenzel, M.; Anderson, R.; Heasman, J. & Wylie, C. 1998. The origin and migration of primordial germ cells in the mouse. *Cell and Developmental Biology*, 9: 393-400.
- Boitani, C.; Politi, M. G. & Menna, T. 1993. Spermatogonial cell proliferation in organ culture of immature rat testis. *Biology of Reproduction*, 48:761-767.
- Boucher, D. M. & Pedersen, R. A. 1996. Induction and differentiation of extra-embryonic mesoderm in the mouse. *Reproduction and Fertility Development*, 8: 765-777.
- Brinster, R. L. & Zimmermann, J. W. 1994. Spermatogenesis following male germ cell transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, 91: 11298-11302.
- Caires, K.; Broady, J. & McLean, D. 2010. Maintaining the male germline: regulation of spermatogonial stem cells. *Journal of Endocrinology*, 205: 133-145.
- Chen, S. & Liu, Y. 2015. Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal and spermatocyte meiosis by Sertoli cell signaling. *Reproduction*, 149: R159-R167.
- Conrad, S.; Renninger, M.; Hennenlotter, J.; Wiesner, T.; Just, L.; Bonin, M.; Aicher, W.; Bühring, H. J.; Mattheus, U.; Mack, A.; Wagner, H. J.; Minger, S.; Matzkies, M.; Reppel, M.; Hescheler, J. 2008. Generation of pluripotent stem cells from adult human testis *Nature*, 456: 344-351.
- Costa, G.; Avelar, G.; Rezende-Neto, J.; Campos-Junior, P.; Lacerda, S.; Andrade, B.; Thome, R.; Hofmann, M. & Franca, L. 2012. Spermatogonial stem cell markers and niche in equids. *Public Library of Science*, 7: e 44091.
- Das, S.; Bonaguidi, M.; Muro, K.; Kessler, J.A. 2008. Generation of embryonic stem cells: limitations of and alternatives to inner cell mass harvest. *Neurosurgery Focus*, 24: 1-12.
- De Felici, M. 2013. *Origin, Migration, and Proliferation of Human Primordial Germ Cells*. 2013 G. Coticchio *et al.* (eds.). *Oogenesis*. Springer-Verlag London. pp.19-37.
- De Rooij, D.G. & Russell, L.D. 2000. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to Ask. *Journal of Andrology*, 21: 776-798.
- Dettin, L.; Ravindranath, N.; Hofmman, M. & Dym, M. 2003. Morphological characterization of the spermatogonial subtypes in the neonatal mouse testis. *Biology of Reproduction*, 69:



- 1565-1571.
- Fagoonee, S.; Hobbs, R. M.; De Chiara, L.; Cantarella, D.; Piro, R. M.; Tolosano, E.; Medico, E.; Provero, P.; Pandolfi, P. P.; Silengo, L. & Altruda, F. 2010. Generation of functional hepatocytes from mouse germ line cell-derived pluripotent stem cells *in vitro*. *Stem Cells and Development*, 19: 1183-1194.
- Ginsburg, M.; Snow, M. H. L. & McLaren, A. 1990. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development*, 110: 521-528.
- Golestaneh, N.; Kokkinaki, M.; Pant, D.; Jiang, J.; Fernandez-Bueno, C.; Rone, J. D.; Haddad, B. R.; Gallicano, G. I. & Dym, M. 2009. Pluripotent stem cells derived from adult human testes. *Stem Cell Development*, 18:1115-1126.
- Gomperts, M.; Garcia-Castro, M.; Wylie, C. & Heasman, J. 1994. Interactions between primordial germ cells play a role in their migration in mouse embryos. *Development*, 120: 135-141.
- Greenbaum, M. P.; Iwamori, T.; Buchold, G. M. & Matzuk, M.M. 2011. Germ cell intercellular bridges. *Cold Spring Harb Perspect Biology*, 3: a005850.
- Hermann, B.; Phillips, B.; Orwig, K. 2011. The elusive spermatogonial stem cell marker? *Biology of Reproduction*, 85: 221-223
- Hofmann, M. C.; Braydich-Stolle, L. & Dym, M. 2005. Isolation of male germ-line stem cells; influence of GDNF. *Developmental Biology*, 279: 114-124.
- Izadyar, F.; Spierenberg, G. T.; Creemers, L. B.; Den Ouden, K. & de Rooij, D. G. 2002. Isolation and purification of type A spermatogonia from the bovine testis. *Reproduction*, 124: 85-94.
- Kanatsu-Shinohara, M.; Onoyama, I.; Nakayama, K. I. & Shinohara, T. 2014. Skp1-Cullin-F-box (SCF)-type ubiquitin ligase FBXW7 negatively regulates spermatogonial stem cell self-renewal. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111: 8826-8831.
- Keros, V.; Hultenby, K.; Borgstrom, B.; Fridström, M.; Jahnukainen, K. & Hovatta, O. 2007. Methods of cryopreservation of testicular tissue with viable spermatogonia in pre-pubertal boys undergoing gonadotoxic cancer treatment. *Human Reproduction*, 22:1384-1395.
- Kvist, K.; Thorup, J.; Byskov, A.G.; Høyer, P.E.; Møllgård, K. & Andersen, C. Y. 2006. Cryopreservation of intact testicular tissue from boys with cryptorchidism. *Human Reproduction*, 21: 484-491.
- Kolasa, A.; Misiakiewicz, K.; Marchlewicz, M. & Wiszniewska, B. 2012. The generation of spermatogonial stem cells and spermatogonia in mammals *Reproductive. Biology*, 12:5-23.
- Kubota, H.; Avarbock, M. R.; Brinster, R. L. 2004. Culture conditions and single growth factors affect fate determination of mouse spermatogonial stem cell. *Biology of reproduction*, 722-731.
- Lawson, K. A. & Hage, W.J. 1994. Clonal analysis of the origin of primordial germ cells in the mouse. *Ciba Foundation Symposium*, 182: 68-84.
- Manku, G. & Culty, M. 2015. Mammalian gonocyte and spermatogonia differentiation: recent advances and remaining challenges. *Reproduction*, 149: R139-R157.
- Mardanpour, P.; Guan, K.; Nolte, J.; Ho Lee, J.; Hasenfuss, G.; Engel, W. & Nayemias, K. 2008. Potency of germ cells and its relevance for regenerative medicine. *Journal of Anatomy*, 213: 26-29.
- McLaren, A. 2003. Primordial germ cells in the mouse. *Developmental Biology*, 262:1-15.
- Milazzo, J.; Vaudreuil, L.; Cauliez, B.; Gruel, E.; Masse, L.; Simeon, N. M.; Mace, B. & Rives, N.; 2008. Comparison of conditions

- for cryopreservation of testicular tissue from immature mice. *Human Reproduction*, 23:17–28.
- Montiel-Eulefi, E.; Sánchez, R.; Rojas, M. & Bustos-Obregon, E. 2009. Epiblast embryo stem cells given origin to adult pluripotent cell populations: primordial germ cell, pericytic and haematopoietic stem cells. A review. *International Journal of Morphology*, 27: 1325-1333.
- Nagano, M.; McCarrey, J. R. & Brinster, R. L. 2001. Primate spermatogonial stem cells colonize mouse testes. *Biology of Reproduction*, 64: 1409-1416.
- Ning, L.; Goossens E.; Geens, M.; Van Saen, D.; Van Riet, I.; He, D. & Tournaye. H. 2010. Mouse spermatogonial stem cells obtain morphologic and functional characteristics of hematopoietic cells in vivo. *Human Reproduction*, 25: 3101-3109.
- Oatley, J. M. & Brinster, R. L. 2012. The germline stem cell niche unit in mammalian testes. *Physiological Reviews*, 92: 577–595
- Ogawa, T.; Ohmura, M. & Ohbo, K: 2005. The niche for spermatogonial stem cells in the mammalian testis. *International Journal of Hematology*, 82: 381-388.
- Phillips, B.T.; Gassei, K. & Orwing, K. E. 2010. Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 365: 1663-1678.
- Riboldi, M.; Marqués Marí, A. I.; Simón, C. 2012. Stem cells and fertility preservation in males. *Fertility Preservation*, 16: 345-352.
- Ryu, B. Y.; Kubota, H.; Avarbock, M. R. & Brinster, R. L. 2005. Conservation of spermatogonial stem cell self-renewal signaling between mouse and rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102: 14302-14307.
- Shinohara, T.; Avarbock, M. & Brinster, R. 1999.  $\beta$ 1 and  $\alpha$ 6 -integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, 96: 5504–5509.
- Spradling, A.; Fuller, M.T.; Braun, R.E. & Yoshida, S. 2011. *Germline Stem Cells*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 3: a002642.
- Sun, F.; Xu, Q.; Zhao, D. & Chen, Ch. D. 2015. Id4 marks spermatogonial stem cells in the mouse testis. *Scientific Reports*, 5:17594.
- Sungtae, K. & Belmonte, J.C. 2011. Pluripotency of male germline stem cells. *Molecules and Cells*, 32: 113–121.
- Suzuki, H.; Sada, A.; Yoshida, S. & Saga, Y. 2009. The heterogeneity of spermatogonia is revealed by their topology and expression of marker proteins including the germ cell-specific proteins Nanos2 and Nanos3. *Developmental Biology*, 336: 222–231.
- Tegelenbosch, R.A.J. & de Rooij, D.G. 1993. A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F 1 hybrid mouse. *Mutation Research*, 290: 193-200.
- Travis, A.; Kim, Y. & Meyer-Wallen, V. 2009. Development of new stem cell-based technologies for carnivore reproduction research. *Reproduction in Domestic Animals*, 44: 22-28.
- Tres, L. L. & Kierszenbaum, A. L. 1983. Viability of rat spermatogenic cells in vitro is facilitated by their coculture with Sertoli cells in serum-free hormone-supplemented medium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, 80: 3377–3381.
- van Pelt, A. M.; Morena, A.R.; van Dissel-Emiliani, F.M.; Boitani, C.; Gaemers, I.C.; de Rooij, D.G. & Stefanini, M. 1996. Isolation of the synchronized A spermatogonia from adult vitamin A-deficient rat testes. *Biology of Reproduction*, 55:439-444.
- von Schonfeldt, V.; Wistuba, J. & Schlatt, S. 2004. Notch-1, c-kit and GFRalpha-1



- are developmentally regulated markers for premeiotic germ cells. *Cytogenetic and Genome Research*, 105:235-239.
- Wu, X.; Goodyear, S. M.; Abramowitz, L. K.; Bartolomei, M. S.; Tobias, J. W.; Avarbock, M. R. & Brinster, R. L. 2012. Fertile offspring derived from mouse spermatogonial stem cells cryopreserved for more than 14 years. *Human Reproduction*, 27:1249–1259.
- Wyns, C.; Van Langendonckt, A.; Wese, F. X.; Donnez, J. & Curaba, M. 2008. Long-term spermatogonial survival in cryopreserved and xenografted immature human testicular tissue. *Human Reproduction*, 23:2402–2414.
- Yango, P.; Altman, E.; Smith, J. F.; Klatsky, P. C. & Nam, D. 2014. Optimizing cryopreservation of human spermatogonial stem cells: comparing the effectiveness of testicular tissue and single cell suspension cryopreservation. *Fertility and Sterility*, 102: 1491-1498.
- Ying, Y.; Qi, X. & Guang-Quan, Z. 2002. Induction of primordial germ cells from murine epiblasts by synergistic action of BMP4 and BMP8B signaling pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, 98: 7858-7862.
- Yon-An, L.; Yong-Hee, K.; Bang-Jin, K.; Mi-Sun, J.; Joong-Hyuck, A.; Ju-Tae, S.; Yong-Seog, P.; Sang-Hoon, L. & Buom-Yong, R. 2013. Cryopreservation of mouse spermatogonial stem cells in dimethylsulfoxide and polyethylene glycol. *Biology of Reproduction*, 89:1-9.
- Yoshida, S.; Shimmura, S.; Nagoshi, N.; Fukuda, K.; Matsuzaki, Y.; Okano, H. & Tsubota, K. 2006. Isolation of multipotent neural crest-derived stem cells from the adult mouse cornea. *Stem Cells*, 24:2714-27622.

Received March 1, 2017.

Accepted June 6, 2017.